

PRESENCIA DE DIGENIDOS BUCEFALIDOS EN BIVALVOS. ESTRATEGIAS MORFOLOGICAS DE LA SUPERFICIE DE ABSORCION EN EL ESPOROCISTO

PRESENCE OF DIGENETIC BUCEPHALIDES IN BIVALVES. MORPHOLOGICAL STRATEGIES OF THE ABSORPTIVE SURFACE IN THE SPOROCYST

Jaume Ferrer, Mercè Durfort, María José Amor, Maria Gràcia Bozzo, José García Valero, Montserrat Poquet, Enric Ribes y Elena Sagrista*

Palabras Clave: Digénidos Bucefálidos, superficie de absorción, esporocisto, ultraestructura

Key Words: Digenetic Bucephalides, absorptive surface, sporocyst, ultrastructure

RESUMEN

Los esporocistos de los digénidos bucefálidos son tubuliformes, formando una trama más o menos espesa de tubos ramificados que invade la gónada del molusco huésped y cuyo diámetro es variable, con zonas abultadas intercaladas por estrangulaciones. La ostra *Ostrea edulis* y el mejillón *Mytilus edulis* son huéspedes de bucefálidos posiblemente pertenecientes a las especies *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) y *Rudolphinus crucibulum* (Stunkard 1974) respectivamente, con porcentajes aproximados de infestación variables: 0,1 % en *R. crucibulum* mientras que en *B. haimeanus* se ha contabilizado hasta un 10 % de ejemplares parasitados. En estos digénidos la superficie de absorción del esporocisto, que generalmente es la membrana externa del tegumento, presenta una morfología también variable. En *B. haimeanus* proyecciones digitiformes de dicha membrana representan un aumento de la superficie, estrategia que generalmente se observa en el esporocisto de la mayoría de digénidos. En *R. crucibulum* en cambio la superficie de absorción es una membrana ondulada, formada prácticamente en su totalidad por hoyos y vesículas de pinocitosis en formación; una intensa vacuolización es la característica más sobresaliente del tejido del huésped próximo a la misma.

ABSTRACT

Sporocysts of digenetic bucephalides are tubular in shape, forming a more or less closed network of ramified tubes which invades the gonad of the host-mollusc, and which diameter varies, showing thick regions in the middle of enlarged ones. The oyster *Ostrea edulis* and the mussel *Mytilus edulis* are hosts of bucephalides, possibly the species *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) and *Rudolphinus crucibulum* (Stunkard, 1974), with infestations about 0,1 % in *R. crucibulum* and about 10 % in *B. haimeanus*. The

* Unitat Biologia Cel·lular (DBF), Fac. Biologia, Univ. Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona

absorptive surface of these digenides, which is generally the external membrane of the integument, shows a different morphology as well. In *B. haimeanus* finger-like projections of the membrane increase its absorptive surface, similarly to the most of the digenetic sporocysts. In contrast, in *R. crucibulum* the absorptive surface is an undulated membrane, full of pits and pynocitic vesicles. An intense vacuolization of the host tissue is the most characteristic feature of it.

INTRODUCCION

Los esporocistos representan la fase intramoluscal en el ciclo de los digénidos en la que se da el proceso multiplicativo por el que se producen las formas metacíclicas subsiguientes en dicho ciclo, es decir, las cercarias.

De acuerdo con esta actividad cercariógena, el esporocisto es una larva en la que la absorción de nutrientes como fuente de materia y de energía constituye una función primordial, función que se realiza a través de la superficie, pues el esporocisto carece de cualquier vestigio de tubo digestivo.

Es por ello que la superficie de absorción constituye un ámbito morfológico y funcional muy conspicuo. Bajo el punto de vista morfológico, al ser ésta a su vez una superficie de trasiego en dos sentidos, ha de estar incrementada, hecho que se consigue mediante estrategias diversas.

El tejido del huésped adyacente a la superficie del parásito muestra síntomas de destrucción o simplemente deterioro, dependiente del grado de la infección, del tamaño y de la edad del molusco, del desarrollo del parásito, y del órgano parasitado.

En el presente trabajo se estudia la morfología ultraestructural comparada de la superficie de absorción o lo que es lo mismo, de la membrana externa tegumentaria del esporocisto de dos digénidos bucefálicos, posiblemente pertenecientes a las especies *Bucephalus haimeanus* (MATTHEWS, 1973) y *Rudolphinus crucibulum* (STUNKARD, 1974) cuyos esporocistos parasitan preferentemente la gónada de *Ostrea edulis* y de *Mytilus edulis* respectivamente.

MATERIAL Y METODOS

Las ostras examinadas proceden del Delta del Ebro, mientras que los mejillones son de batea y proceden de la costa gallega. Los porcentajes de

infestación son distintos en ambas especies: así en el caso de *B. haimeanus* se ha evaluado hasta un 10 % de ostras infestadas mientras que en *R. crucibulum* el número de mejillones parasitados es de alrededor del 0,1 %.

La parasitosis de *B. haimeanus* se concreta macroscópicamente en la aparición de una serie de tubos blanquecinos que apenas destacan respecto al color claro dominante de la gónada de la ostra. La parasitosis de *R. crucibulum* en el mejillón es mucho más patente: se trata de formaciones tubulares ramificadas de un color parduzco, fáciles de apreciar sobre el fondo amarillo de la gónada del molusco.

En el tratamiento del material para su observación al MET se ha seguido el protocolo convencional puesto a punto a tal efecto, concretamente en lo que se refiere a la inclusión (SPURR, 1969) y al contrastado de los cortes (REYNOLDS, 1963). Para la observación al MEB se ha procedido a una metalización de material en oro tras una previa doble fijación con paraformaldehído-glutaraldehído, una posfijación con OsO_4 y una deshidratación posterior.

RESULTADOS

Como en todos los bucefálicos, los esporocistos de *B. haimeanus* son tubulares; los tubos presentan zonas engrosadas limitadas por estrangulaciones transversales (Fig. 3). La superficie es rugosa o localmente estriada o replegada. En el material en estudio son frecuentes zonas de ruptura, posiblemente causadas artefactualmente, en las que se insinúan las cercarias (Fig. 4).

Al microscopio electrónico de transmisión el tegumento aparece relativamente delgado, repleto de vesículas desnudas y vesículas revestidas (Fig. 7), que coexisten todas ellas con mitocondrias. Este tegumento descansa sobre una potente lámina

basal, frecuentemente ondulada (Fig. 5 y 6), carácter que puede estar en correspondencia con los plegamientos visibles en la superficie (Fig. 3); esta lámina basal presenta discontinuidades por las que se canalizan los distintos orgánulos y productos hacia el parénquima (Fig. 7).

La superficie de absorción en el caso de *B. haimeanus* está dominada por unas proyecciones digitiformes, sinuosas, con una matriz densa a los electrones (Fig. 5 y 6). En detalle se observa que a veces estas proyecciones son ramificadas y que entre ellas hay una solución de continuidad de la membrana externa del tegumento (Fig. 6). Vacuolas y vesículas vacías dominan el tejido adyacente al tegumento del parásito.

En *R. crucibulum* el tegumento del esporocisto también contiene un gran número de vesículas claras de pinocitosis cerca de la membrana externa (Fig. 8 y 9) estando la matriz tegumentaria repleta de diversos orgánulos membranosos vesiculares y vacuolares con un contenido claro o finamente granuloso que coexisten con un tipo de vesículas de contenido fuertemente denso que, según la orientación del corte, presentan una forma típica de palillo de tambor (Fig. 8). También se observan numerosas mitocondrias con una matriz densa (Fig. 8 flechas gruesas). La matriz tegumentaria está parcialmente partida por profundas criptas de la membrana externa del tegumento (Fig. 8 y 9).

La superficie de absorción en el esporocisto de *R. crucibulum* presenta una estrategia morfológica distinta. La membrana externa del tegumento presenta una ondulación característica tanto por cuanto en prácticamente toda su extensión está formada por hoyos de pinocitosis (Fig. 8 y 9) algunos de ellos con un revestimiento denso a los electrones (Fig. 8 flechas delgadas). Externamente esta superficie está recubierta por un glucocálix finamente granuloso medianamente denso a los electrones.

La vacuolización es la pauta general del tejido del huésped próximo a la superficie del parásito (Fig. 10 y 11), aunque a veces puede aparecer granuloso, observándose alguna que otra porción del mismo aprisionada en las criptas tegumentarias del parásito (Fig. 8 y 9). Todas estas características indican un fuerte trasiego de nutrientes hacia el interior de la larva en donde hay una gran actividad en lo que atañe a la producción de cercarias.

DISCUSION

En los casos estudiados, en el que el parasitismo está en una avanzada fase de evolución, a pesar de la forma tubular ramificada del esporocisto, el cual puede progresar en una extensión relativamente grande, se puede considerar que se trata de una infección que corre a cargo, no de uno, sino de varios esporocistos, independientes o semiindependientes entre sí. Ello es debido a que en una fase primigenia de la parasitosis, el esporocisto madre, o esporocisto que inicia la infección, de forma también tubular, da lugar a varios esporocistos hijos, los cuales en su desarrollo se alargan y adoptan forma tubular. En este sentido el contorno irregular de los esporocistos de *R. crucibulum* observados en las figuras 10 y 11 hace pensar que atraviesan por esta fase de alargamiento y ramificación.

Las estrategias morfológicas de las superficies de absorción estudiadas son bien distintas una de la otra. En *B. haimeanus* la superficie está incrementada mediante proyecciones digitiformes ramificadas lo que posiblemente puede estar en correspondencia con un aumento de transportadores de membrana, responsables del trasiego de material en ambos sentidos y en particular de la absorción de nutrientes hacia el interior de la larva, aunque no es descartable una pinocitosis materializada por el gran número de vesículas desnudas y recubiertas. Sin embargo, estas proyecciones digitiformes en realidad forman parte de un citoplasma reticulado que constituye mayoritariamente lo que JAMES, BOWERS y RICHARDS (1966) denominan tegumento externo que es un estrato sincicial nucleado que recubre externamente el cuerpo de la larva, teniendo lugar la absorción en este retículo citoplasmático. El tegumento descrito en el presente trabajo es un subtegumento de acuerdo con la denominación de estos autores. Tal y como se muestra en las figuras 5, 6 y 7, el tegumento externo en el bucefárido en estudio aparece en un estado de degeneración considerable habiéndose encontrado escasos núcleos; tal degeneración ha sido descrita en otros digénidos cuyos esporocistos presentan también dos estratos tegumentarios (POPIEL y JAMES, 1978).

En cambio en *R. crucibulum* más que un aumento de superficie real, lo que ocurre es que toda la superficie de absorción está involucrada en una

endocitosis, por lo que, en el posible caso de que esta endocitosis esté mediada por receptores de membrana, han de ser estos receptores los responsables, aunque indirectos, de la absorción. La va-

cuolización es la materialización del deterioro y degeneración del tejido adyacente al parásito, procesos degradativos asociados a la constante incorporación del material del huésped a la larva.

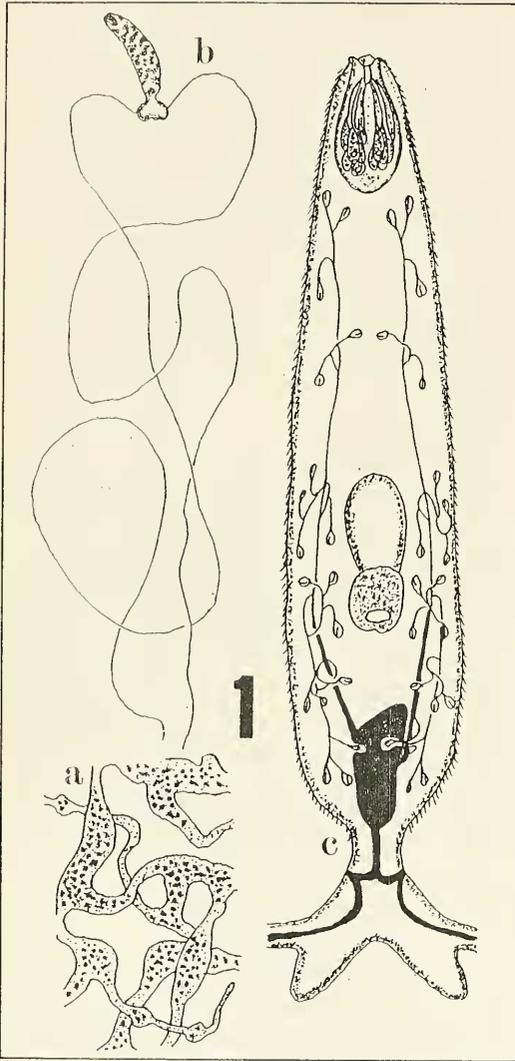


Fig. 1. Esquemas de las larvas intramoluscales de *Rudolphinus crucibulum* (Stunkard, 1974). a: Esporcisto. b: Cercaria con los típicos apéndices caudales extendidos. 80X. c: Detalle de la cercaria en el que se patentiza el aparato excretor. 800X. (Según MATTHEWS, 1973).

Fig. 1. Schemes of the intramolluscan larvae of *Rudolphinus crucibulum* (Stunkard, 1974). a: Sporocyst. b: Cercaria with the typical caudal appendix extended. 80X. c: Detail of the cercaria showing the excretory apparatus 800X (After MATTHEWS, 1973)

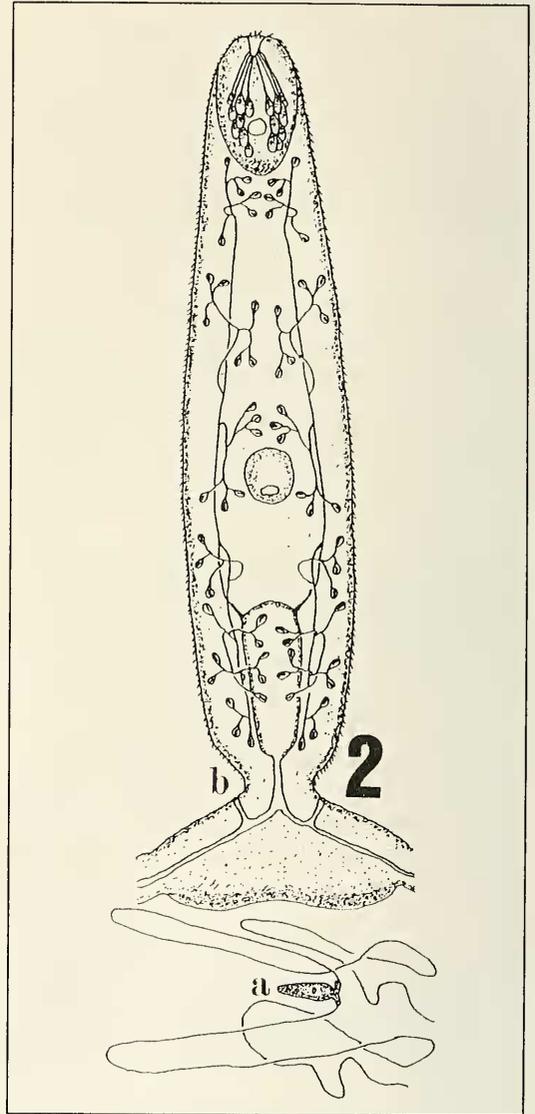
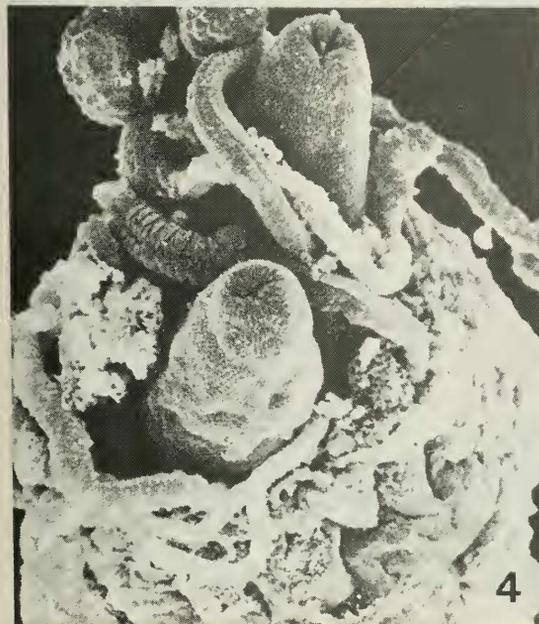
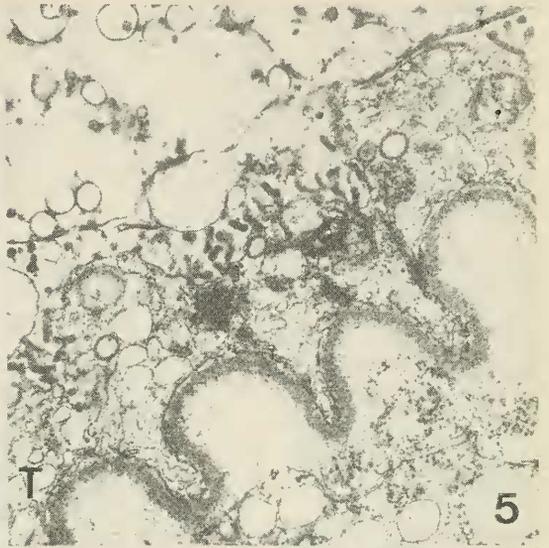
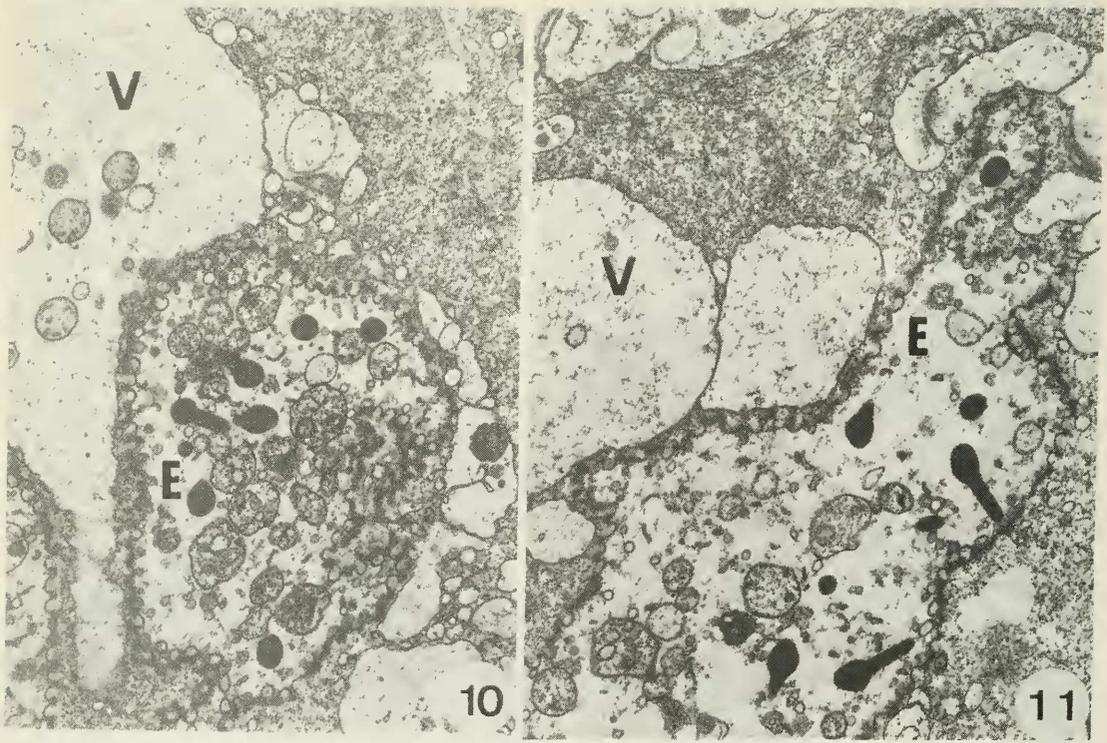


Fig. 2. *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854). a: Cercaria con los apéndices caudales extendidos. 70X. b: Detalle de la cercaria en el que se pone de manifiesto el aparato excretor. 600X. (Según MATTHEWS, 1973).

Fig. 2. *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854). a: Cercaria with the caudal appendix extended. 70X. b: Detail of the cercaria showing the excretory apparatus. 600X. (After MATTHEWS, 1973).





BIBLIOGRAFIA

FERRER, J.R. 1988. Estudio ultraestructural del esporocisto hijo de *Proctoeces maculatus* (DIGENEA FELLODISTOMATIDAE). Estructuras vesículo-membranosas del tegumento. *Misc. Zool.*, 12: 1-10.

JAMES, B.L. y BOWERS, E.A. 1967. Histochemical observations on the occurrence of carbohydrates, lipids and enzymes in the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimeana* Lacaze-Duthiers, 1854 (Digenea: bucephalidae). *Parasitology*, 57: 79-86.

JAMES, B.L., BOWERS, E.A. y RICHARDS, J.G. 1966. The ultrastructure of the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimeana* Lacaze-Duthiers, 1854 (Digenea: Bucephalidae) from the edible cockle, *Cardium edule* L. *Parasitology*, 56: 753-762.

MATTHEWS, R.A. 1973. The life-cycle of *Bucephalus haimeanus* Lacaze-Duthiers, 1854 from *Cardium edule*. *Parasitology*, 67: 341-350.

MATTHEWS, R.A. 1973. The life-cycle of *Prosorhynchus crucibulum* (Rudolphi, 1819) Odner, 1905, and a comparison of its cercaria with that of *Prosorhynchus squamatus* Odner, 1905. *Parasitology*, 66: 133-164.

POPIEL, I. y JAMES, B.L. 1978. Variations in the ultrastructure of the daughter sporocyst of *Microphalus pygmeus* (Digenea: Microphallidae) in chemically defined media. *Parasitology*, 76: 349-358.

REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.

SPURR, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, 26: 36-43.

Fig. 3. Esporocistos de *B. haimeanus* parásitos de *Ostrea edulis*. 350X.

Fig. 3. Sporocysts of *Bucephalus haimeanus* parasites of *Ostrea edulis*. 350X.

Fig. 4. Zona fracturada de un esporocisto de *B. haimeanus* por la que sobresalen dos cercarias de su interior rodeadas por los apéndices caudales de éstas u otras cercarias. 550X.

Fig. 4. Section of a sporocyst of *B. haimeanus* inside of which two cercariae are seen. They are surrounded by the caudal appendix either of them or other cercariae. 550X.

Fig. 5. Tegumento (T) del esporocisto de *B. haimeanus* repleto de vesículas y que descansa sobre una aparente lámina basal ondulada. La presencia de vacuolas vacías es la tónica dominante del tejido adyacente al tegumento de la larva. 15000X.

Fig. 5. Integument (T) of the sporocyst of *Bucephalus haimeanus* with numerous vesicles inside, lying on an undulated basal lamina. Empty vacuoles is characteristic of the adjacent tissue of the larva integument. 15000X.

Fig. 6. Detalle del tegumento en el que se aprecia la morfología de las eminencias de la membrana externa. 25000X.

Fig. 6. Detail of the integument where the eminences of the external membrane are shown. 25000X.

Fig. 7. La lámina basal (1b) presenta discontinuidades por las que se canalizan productos hacia el parénquima (flecha). 35000X.

Fig. 7. Basal lamina (1b) showing discontinuities where products going to parenchyma are canalized (arrow). 35000X.

Fig. 8. Tegumento y superficie de absorción de *R. crucibulum*. La matriz tegumentaria está repleta de orgánulos membranosos entre los que destacan mitocondrias, algunas señaladas con flechas gruesas. También son patentes vesículas de contenido denso que según la orientación del corte aparecen en forma de palillo de tambor. La superficie de absorción es ondulada y formada casi en su totalidad por hoyos y vesículas de pinocitosis alguno recubiertos (flechas delgadas); esta superficie surca el tegumento mediante criptas y está cubierta externamente por un glucocalix. 55000X.

Fig. 8. Integument and absorptive surface of *Rudolphinus crucibulum*. The integumentary matrix is full of membranous organules among of which mitochondriae are detected (thick arrows). Dense content vesicles, that are tambour stick in shape depending of section orientation, are also seen. The absorptive surface is undulated, and is almost entirely formed by pits and vesicles of pinocytosis, some are coated ones, (thin arrows); this surface crosses the integument by means of crypts and is covered externally by glycocalix. 55000X.

Fig. 9. Detalle de una cripta tegumentaria, recubierta externamente por glucocalix y en cuyo interior se observa una porción del material granuloso del tejido del huésped. 85000X.

Fig. 9. Detail of an integumentary crypt, covered externally by a glycocalix. Inside, a granulous material of the host tissue is seen. 85000X.

Fig. 10 y 11. Imágenes en las que se pone de manifiesto la vacuolización (V) del tejido del huésped asociada a la presencia del esporocisto (E) de *R. crucibulum*. 20000X.

Fig. 10 and 11. The vacuolization (V) of the host tissue associated to the presence of sporocyst (E) of *R. crucibulum* is shown in these figures. 20000X.

